

розгортки по вертикалі; симетрування підсилювача з допомогою R_4 на максимальне пригнічення синфазного сигналу.

Схеми конденсаторів напруги і генератора прямокутних імпульсів монтуються на лампах L_{21} , L_{23} , L_{24} , L_{25} і L_{37} . Панель для лампи L_{37} вмонтовується в отвір, що залишається після видалення конденсатора C_{32} . Розміщення інших деталей, зокрема, потенціометрів ясно з принципової схеми. Сигнальна лампа L_{17} , на місці якої встановлюється R_{26} , переноситься в лівий верхній кут лицевої панелі.

Настроювання компараторів зводиться до зменшення гістерезиса, якщо він великий, шляхом підбору катодного опору R_{11} і R_{20} . Решта вузлів схеми настраюються за правилами імпульсної техніки [2] і особливого пояснення не потребують. Генератор пускових імпульсів ніякої настройки не потребує, якщо не провадиться зміна діапазону повторення. Клема K_7 , яка використовується для виводу сітки тиратрона (рис. 3), повинна бути заздалегідь ізольована від корпусу приладу.

Кілька осцилографів типу ЕНО-1, схема яких була змінена описаним нами способом, з успіхом експлуатуються протягом восьми років у лабораторії фізіології клітини Інституту цитології АН СРСР. Прилади виявились дуже зручними для проведення дослідів на поодиноких нервових і м'язових волокнах, як при позаклітинному, так і при внутріклітинному методах реєстрації біопотенціалів. В обох випадках застосовувались катодні повторювачі з нульовим сітковим струмом і малою вхідною ємністю [4], які було змонтовано в безпосередній близькості від електродів. Симетричний вхід підсилювача дозволяє застосовувати для подразнення генератори імпульсів струму з несиметричним виходом. Задача підсумування імпульсів при цьому вирішується дуже просто. Високий ступінь пригнічення синфазного сигналу в підсилювачі вертикального відхилення дозволяє одержувати записи досліджуваних потенціалів при повній відсутності так званого «артефакту подразнення».

Стабільність нуля підсилювача в разі необхідності може бути значною мірою підвищена живленням накалювання ламп першого та другого каскадів від джерела з електронною стабілізацією з коефіцієнтом стабілізації 300—400.

Наявність в осцилографі генератора імпульсів змінної амплітуди й тривалості та його застосування пояснень не потребують. Імпульс малої тривалості, що виробляється другим генератором, може бути використаний як рухлива мітка або для запуску зовнішнього стимулятора при проведенні дослідів із застосуванням двох імпульсів. Оскільки імпульси, що генеруються, зберігають своє положення на екрані з будь-якою швидкістю розгортки, то її зміни приводитимуть до змін часового інтервалу між імпульсами, що треба мати на увазі і що може бути застосовано в деяких дослідженнях.

Література

1. Генерирование электрических колебаний специальной формы.— Сов. радио, М., 1951.
2. Ицхоки Я. С.— Сов. радио, М., 1949.
3. Костюк П. Г.— Микроэлектродная техника. К., 1960, АН УССР.
4. Можаяев Г. А.— Цитология, 1968, 10, 1.
5. Находкина Л. Г. и Евдокимов С. А.— Физиол. журн. СССР, 1959, 45, 6, 716.
6. Петрович Н. Т. и Козырев А. В.— Сов. радио, М., 1954.

Надійшла до редакції
7.VIII 1967 р.

До методики визначення вмісту альдостерону в сечі

І. В. Касьяненко, Ф. М. Ейдельман

Відділ клінічної фізіології Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Величезна роль надниркових залоз у всіх процесах життєдіяльності організму не викликає сумніву. Однаково важливе значення мають їх глюкокортикоїдна і мінералокортикоїдна функції. Для з'ясування мінералокортикоїдної функції надниркових залоз запропоновано визначати Na/K коефіцієнт у біологічних рідинах організму (що дає досить посереднє уявлення про згадану функцію надниркових залоз) і вміст основного мінералокортикоїда — альдостерону.

Одним з перших запропонованих методів визначення альдостерону був фізико-хімічний метод, в основі якого лежить хроматографія на папері [2, 3, 4, 7, 8]. Перевага хроматографії полягає в диференційованому розподілі сполук. Для виділення альдо-

стерону із сполук з схожими розподільними властивостями здійснюють ацетилювання між двома хроматографічними процесами. Кількість альдостерону обчислювали за заздалегідь побудованою колібрувальною прямою, одержаною при реакції гідрокортизону або кортизону з синім тетразолієм.

Як показав досвід ряду дослідників і, зокрема наш, метод визначення альдостерону в сечі із застосуванням хроматографії на папері дуже громіздкий і дає можливість здійснити вкрай обмежену кількість визначень (одне дослідження триває 14 днів). Тому останнім часом запропоновано ряд нових методів визначення, зокрема, з допомогою тонкошарової хроматографії альдостерону [9]. Метод оснований на двомірній хроматографії альдостерону на силікагелі. Для хроматографії застосовують дві системи розчинників: циклогексан-ізопропанол у співвідношенні 7:3 і хлороформ-льодяна оцтова кислота у співвідношенні 8:2. Альдостерон розташовується в точці пересічення двох уявних ліній, що проходять крізь видимі (після проявлення) плями головних стероїдів (11-дезоксикортизол і 11-дегідрокортикостерон).

При застосуванні цього методу, до речі, значно менш громіздкого, тривалість дослідження скорочується приблизно на одну третину порівняно з методом хроматографії на папері. Проте цей метод потребує деяких дефіцитних реактивів.

У 1964 році був запропонований новий колориметричний метод визначення альдостерону в сечі [11]. Метод оснований на хроматографії на колонках з силікагелем і амберлітом Монобед МБ-3. Цей метод не такий тривалий, як описаний раніше, досить точний і потребує застосування менш дефіцитних реактивів. Метод цілком придатний для застосування в клінічних умовах. Ми внесли деякі зміни в цей метод, які будуть описані далі.

Реактиви і обладнання. 1) Хлороформ свіжоперегнаний; 2) соляна кислота 37%-на; 3) розчин NaOH Н/10; 4) сірчанокислий натрій, безводний; 5) толуол очищений і зневоднений металічним натрієм; 6) метанол перегнаний з мінімальним вмістом альдегіду і ацетону; 7) лігроїн; 8) ацетон; 9) петролейний ефір; 10) хлористоводний фенілгідразин, перекристалізований; 11) силікагель КСК або КСК-2, подрібнений на кульовому млині і просіяний; 12) іонообмінна смола Монобед МБ-3 або суміш амберліту Іра-120 та Іра-410; 13) скловата; 14) колонки для силікагеля 0,6×20 см; 15) колонки для іонообмінної смоли 0,5×5 см; 16) спектрофотометр; 17) апарат для струшування; 18) установка для вакуумної перегонки.

Оброблення іонообмінних смол. Зважують 10 г амберліту Іра-120 і насипають у розподільну воронку. Для його промивання застосовують 100 мл 3,5%-ного розчину HCl; потім промивання продовжують дистильованою водою до нейтральної реакції. При обробленні амберліту Іра-410 насипають 15 г його в розподільну воронку і промивають 100 мл 3,5%-ного розчину соди, потім дистильованою водою до нейтральної реакції. Після промивання обидві смоли змішують ще у мокрому стані та зберігають обов'язково під водою. Перед введенням амберліту в колонку в її кінець вкладають шматочок скловати.

Визначення альдостерону

I. Гідроліз сечі. 1) Протягом доби збирають сечу в посудину, яка містить кілька мілілітрів льодяної оцтової кислоти і хлороформу. 2) Одну третину добової кількості сечі фільтрують і підкислюють концентрованою соляною кислотою до рН 1,5, після чого залишають сечу на цілу добу при кімнатній температурі.

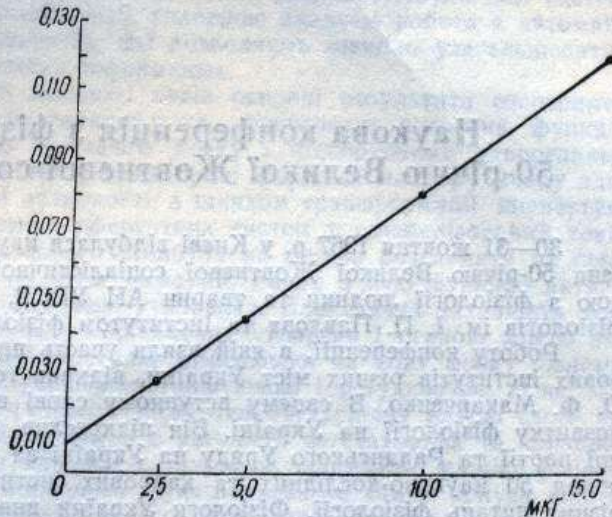
II. Екстракція хлороформу. 1) Досліджену кількість сечі тричі екстрагують третиною об'єму хлороформу (струшують кожного разу по 20 хв в апараті для струшування). 2) Усі три хлороформні екстракти зливають разом і промивають 0,1 Н. розчином NaOH (десятою частиною від об'єму екстракту) протягом 1—2 хв. 3) Екстракт промивають тричі дистильованою водою (по 30 мл) до нейтральної реакції. 4) Промивні рідини (луг і воду) з'єднують і промивають один раз 30 мл хлороформу. 5) 30 мл хлороформу додають до основного хлороформного екстракту і зневоднюють сірчанокислим натрієм до просвітлення розчину. Ми вважаємо доцільним до зневоднення ще раз промити дистильованою водою. 6) Екстракт випаровують до сухого залишку при температурі 45° С.

III. Перша хроматографія. 1) Сухий залишок розчиняють в 4—5 мл очищеного хлороформу і пропускають у колонку з силікагелем, заздалегідь промитим хлороформом. Після цього колонку промивають 100 мл суміші хлороформу і ацетону 99:1 для видалення пігментів сечі. Для елюювання стероїдів через колонку пропускають суміш хлороформу і ацетону (50:50), яку випарюють до сухого залишку в вакуумній установці при температурі 45° С. 2) Сухий залишок розчиняють в 9 мл водного розчину метанолу (сім частин метанолу і три частини води), наливають у центрифужну пробірку і двічі-тричі промивають з 4 мл суміші толуол-лігроїну (2:2). Кожного разу продовжують центрифугування, після чого верхній шар видаляють. 3) Водний розчин метанолу двічі-тричі промивають з 4 мл суміші толуол-петролейного ефіру (2:2). Кожного разу повторюють центрифугування, після чого верхній шар видаляють. 4) Очищений розчин метанолу випарюють і висушують у фарфоровій чашці на водяній бані при температурі 60° С. Ми здійснювали випаровування під струменем азоту.

IV. Друга хроматографія. 1) Сухий залишок розчинюють в 9 мл метанолу і двічі тричі пропускають через колонку, заповнену смолою Монобед МБ-3 і заздалегідь промити метанолом. Монобед МБ-3 ми замінили сумішшю іонообмінних смол Іра-120 та Іра-410, які входять до складу смоли Монобед МБ-3.

Якщо кількість розчиненого в метанолі залишка при цьому зменшується, його доводять метанолом до 9 мл. Після цього переходять до забарвлення і спектрофотометрування.

V. Кількісне визначення альдостерону. 1) 9 мл метанольного екстракту ділять на дві рівні частини (зразки А і Б). 2) До зразка А додають 1,5 мл 1%-ного водного розчину фенолгідразину (готують *ex tempore*). 3) До зразка Б додають 1,5 мл дистильованої води. 4) Зразок В — у пробірку наливають 4,5 мл метанолу і додають 1,5 мл 1%-ного розчину фенолгідразину. 5) Контроль — у пробірку наливають 4,5 мл чистого метанолу і 1,5 мл дистильованої води. 6) Всі зразки витримують на водяній бані 30 хв при температурі 80° С, потім швидко охолоджують і спектрофотометрують проти контролю при довжині хвилі 395 мкм. 7) При остаточному підрахуванні від показань спектрофотометра зразка А віднімають суму показників зразків Б+В, помножують на 2 (досліджувану пробу ділять на дві рівні частини) і помножують на 3 (досліджують третину сечі, зібраної за добу). Підрахування здійснюють по калібрувальній кривій альдостерону. Одержана нами крива наведена на рисунку.



Калібрувальна крива визначення кількості альдостерону.

По вертикалі — екстинція показань спектрофотометра, по горизонталі — альдостерон в мкг.

Автори, які запропонували цей метод, вважають, що їх результати більш точні, метод приводить до меншої втрати альдостерону, ніж при методі Новачинського. Дослідження, проведені авторами у 50 здорових людей, показали, що вміст альдостерону у сечі чоловіків становить 10,62—15,80 γ за 24 год, а у жінок — 10,50—16,00 γ за 24 год.

На нашу думку, метод колориметричного визначення вмісту альдостерону в сечі зручний, дозволяє одночасно здійснювати кілька досліджень і потребує небагато часу.

Колориметричний метод визначення альдостерону в сечі застосований нами при вивченні мінералокортикоїдної функції надниркових залоз у осіб з підвищеною секреторною функцією шлунка та його секреторною недостатністю (анацидні і гіпацидні гастрити). Секреторну функцію шлунка визначали фракційним методом з введенням у шлунок 300 мл 5%-ного розчину алкоголю або розчину гістаміну (1:1000) по 0,1 мл підшкірно на 10 кг ваги.

Загалом обслідувано 22 осіб. У частини хворих досліджування здійснені по дві три рази, а з результатів їх виведені середні показники.

У 16 осіб з секреторною недостатністю шлунка вміст альдостерону в сечі коливався в межах від 0 до 18,6 γ за добу.

У шести осіб з гіперсекрецією вміст альдостерону в сечі коливався від 4,2 до 20,4 γ за добу.

Література

1. Герасимова Е. Н. — Терап. архив, 1959, XXXI, 9, 42.
2. Герасимова Е. Н. — Методы и аппаратура, М., 1963, II, 97.
3. Иваненко Т. И., Сахацкая Т. С. — Пробл. эндокринологии и гормонотерапии, 1962, 1, 50.
4. Юдаев Н. А. — Химические методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях, М., 1961, 98.
5. Bruinvels I. — Experientia, 1963, XIX, 10, 551.
6. Bruinvels I. and van Noordwijk I. — Nature, 1962, 193, 4822, 1260.
7. Moolenaar A. I. — Acta endocrin. (Copenhagen), 1957, 25, 161.
8. Neher R., Wettstein A. — Helv. chim. Acta, 1956, 39, 2062.
9. Nishikaze O. und Staudinger H. — Klin. Wochenschr., 1962, 19, 1014.
10. Nowaczynski W. — Canad. J. Biochem., 1957, 35, 425.
11. Pittner A., Cassia B., Ferlito S. — Folia endocrinol., 1964, 17, 1, 106.